Aus dem Hygiene-Institut der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. med. Richard-Ernst Bader

Serologische Untersuchungen bei Stämmen der Gattung Spirillum

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

dem Fachbereich Theoretische Medizin
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Wolf Dietrich Mayer
aus Weinsberg

1970

Aus dem Hygiene-Institut der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. med. Richard-Ernst Bader

Serologische Untersuchungen bei Stämmen der Gattung Spirillum

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

dem Fachbereich Theoretische Medizin
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Wolf Dietrich Mayer
aus Weinsberg

1970

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Dekan: Professor Dr. med. H.J. Knüttgen

Berichterstatter: Professor Dr. med. R.-E. Bader

FOTODRUCK PRÄZIS Barbara v. Spangenberg KG • Tübingen

Meinen Eltern

I N H A L T

	Seite
Einleitung und Fragestellung	1
Eigene Untersuchungen	6
I. Material	6
1. Stämme und Antigene	6
a) OH-Antigene	7
b) O-Antigene	7
2. Seren	7
a) OH-Seren	7
b) H-Seren	7
3. Latex	8
4. Erythrocyten	8
II. Methoden	9
1. Voruntersuchungen	9
a) Kulturen	9
b) Beweglichkeit	9
c) Stabilitätsproben	9
2. Hauptuntersuchungen	10
a) Reagenzglasagglutination	10
α) OH-Agglutination	10
β) H-Agglutination	10
b) Indirekte Hämagglutination	10
c) Latex-Geißel-Agglutination	11
d) Absorptionen	12

		Seite
III	Ergebnisse	14
	1. Voruntersuchungen	14
	a) Beweglichkeit	14
	b) Stabilitätsproben	14
	2. Hauptuntersuchungen	16
	a) Reagenzglasagglutination	16
	α) OH-Agglutinationen mit homologen und heterologen Seren	16
	β) Einfluß physikalischer und chemischer Faktoren auf die Antigene	17
	γ) H-Agglutinationen	19
	b) Indirekte Hämagglutinationen	20
	c) Latex-Geißel-Agglutinationen	22
	d) Absorptionen	25
	e) Agglutinationstypen	30
IV	Diskussion	30
V	Zusammenfassung	35
VI	Literaturverzeichnis	36

E I N L E I T U N G

Die Schraubenbakterien werden von LEEUWENHOEK in seinen Briefen an die Royal Society in London 1683 neben "Kügelchen und Stäbchen" erstmals erwähnt. 1786 werden die Schraubenbakterien von MÜLLER in seinem System, dem ersten Versuch einer systematischen Einteilung der Bakterien überhaupt, aufgrund ihrer morphologischen Erscheinung als eine eigene Gattung "Vibrio" aufgeführt. EHRENBERG verwendet 1830 als erster den Gattungsnamen "Spirillum". Als Arten werden in seinem"System der Infusorien" 1838 Spirillum undula, Sp. tenue und Sp. volutans beschrieben. COHN, der 1872 zum ersten Mal seit der Entdeckung der Bakterien die Zugehörigkeit dieser zu den Pflanzen klar ausspricht, gelingt es auch bei Spirillum volutans, Geißeln ohne Färbung zu beobachten (1875). Dies wurde von ihm jedoch noch nicht als Artmerkmal berücksichtigt. HUEPPE, der 1886 die Bakterien aufgrund ihrer Fähigkeit Sporen zu bilden in zwei große Gruppen, die Endosporen und Arthrosporen einteilt, führt die Spirillen bei den endogenen Sporenbildnern auf. 1895 zieht FISCHER zur Unterscheidung der Bakterien neben der Morphologie und Sporenbildung die Begeißelung als Artmerkmal hinzu. Er verneint Sporenbildung bei der Familie der Spirillaceae, die er in die Gattungen "Vibrio" und "Spirillum" unterteilt. Letztere wird unter anderem charakterisiert durch ein "meist polares Geißelbüschel aus mehreren langen Haupt- und mehreren kurzen Nebengeißeln." Im Gegensatz zu FISCHER nimmt MIGULA (1900) die Endosporenbildung als Gattungsmerkmal in sein System wieder auf, wie sie von ESMARCH 1887 bei Spirillum rubrum und von SOROKIN 1890 bei Spirillum endoparagogicum beobachtet worden war. Auch bleibt die polare Begeißelung als wichtiges Charakteristikum erhalten.

Überblickt man die Entwicklung der Bakterienforschung seit ihrem Beginn bei LEEUWENHOEK, so fällt das geringe Interesse auf, das die Gattung Spirillum EHRENBERG trotz ihrer Auffälligkeit in Form und Gestalt durch die Forscher der letzten Jahrhunderte erfahren hat. Die Ursache mag einesteils darin

zu suchen sein, daß die Spirillen mit Ausnahme des von CARTER 1888 beschriebenen Spirillum minus für den Menschen nicht pathogen sind. Ein weiterer Grund dürfte zweifellos darin liegen, daß die Spirillen als Reinkultur sehr schwer zu züchten sind. Es wurden deshalb gegen Ende des letzten Jahrhunderts verstärkt Anstrengungen unternommen, sichere Isolierungs- und Züchtungsmethoden zu erarbeiten. Zwar gelang es erstmals ESMARCH 1887, wenn auch durch Zufall, ein Spirillum in Reinkultur zu züchten, dem er den Namen Spirillum rubrum gab. Auch konnte BEIJERINCK 1893 eine Reinkultur von Spirillum tenue erhalten. Weiterhin konnte KUTSCHER 1895 (a) aus flüssigem Mist Reinkulturen von vier Spirillenarten züchten. Insgesamt aber waren die Ergebnisse nicht sehr befriedigend. Erst den eingehenden Studien GIESBERGERS (1936) ist es zu verdanken, daß wir heute über geeignete Isolierungsmethoden und annähernd optimale Nährböden verfügen.

Neben diesem Problem wandte sich das Interesse der Untersucher nun auch mehr der Cytologie und den physiologischen Eigenschaften der Spirillen zu. ZETTNOW berichtet 1897 über den cytologischen Aufbau verschiedener Spirillenarten. REICHENBACH lehnt 1901 echte Verzweigungen bei Spirillen ab, wie sie zuvor von KUTSCHER (1895, b) beobachtet worden waren. In dieser Arbeit hatte KUTSCHER (1895, b) auch eine Sporenbildung bei den Spirillen abgelehnt. 1903 berichtet ELLIS ausführlich über den cytologischen Aufbau des Spirillum volutans. SWELLENGREBEL befaßt sich 1909 mit der vergleichenden Cytologie der Spirillen und Spirochäten. MEYER entdeckt 1912 bei Spirillum volutans einen Reservestoff, den er "Volutin" nennt. Das Geißel-Problem wird 1909 wieder von REICHERT aufgegriffen, der sich mit der Sichtbarmachung der Geißeln unter anderem auch bei verschiedenen Spirillen beschäftigt. FUHRMANN untersucht 1910 die Geißeln bei Spirillum volutans. Über physiologische Eigenschaften der Spirillen berichtet erstmals BEIJERINCK (1893, 1895), der sich mit der optimalen Sauerstoffspannung und Denitrifikation bei dieser Bakterienart befaßt. VAHLE untersucht 1910 die Pigment-

bildung bei Spirillum rubrum, zugleich berichtet er über die optimale Sauerstoffspannung bei Spirillum rubrum und Spirillum volutans. 1925 beschäftigt sich BEIJERINCK mit der Stickstoffbindung bei Spirillum lipoferum, welche er ebenso wie SCHRÖDER (1932) ablehnt.
Sehr eingehend befaßt sich GIESBERGER (1936) in seinen Arbeiten mit der Gattung Spirillum EHRENBERG. Wie erwähnt, gelingt es ihm, geeignete Nährböden für die verschiedenen Spirillenarten zu entwickeln. Er untersucht die Stoffwechselleistungen der verschiedenen Arten und studiert intensiv deren Atmungsprozesse. Er weist nach, daß morphologisch verschiedene Stämme sich auch in ihren Stoffwechselleistungen unterscheiden. Ihm ist die erste umfassende, alle bekannten Merkmale berücksichtigende Charakterisierung der Gattung Spirillum zu verdanken.
Mit der Entwicklung des Elektronenmikroskops wendet sich das Interesse in der Spirillenforschung erneut cytologischen Problemen zu.
1940 veröffentlicht LEWIS eine Arbeit über die Zelleinschlüsse bei Spirillen. PIJPER untersucht 1949 die Geißeln von Spirillum volutans, und zusammen mit CROCKER, VAN DER WALT und SAVAGE (1953) die Geißeln von Spirillum serpens. Außerdem befassen sie sich mit der Art der Beweglichkeit und kommen zu dem Schluß, daß diese unabhängig von den Geißeln erfolge. 1951 entwickelt LEIFSON eine neue Geißelfärbemethode und nimmt zu der Frage der Geißeln Stellung. HOUWINK veröffentlicht 1953 eine Arbeit über die Zellwandstrukturen der Spirillen. VAN ITERSON befaßt sich 1953 mit der Frage der Einzelligkeit der Gattung Spirillum, und CHAPMAN und KROLL nehmen 1957 zu demselben Problem bei Spirillum serpens Stellung.
In einer ausführlichen Arbeit über die Gattung Spirillum, in der sie sich im besonderen mit der Cytologie dieser Organismen befassen, berichten WILLIAMS und RITTENBERG (1957) unter anderem über Mikrocysten bei verschiedenen Spezies dieser Gattung. Sie schlagen vor, diese in die Gattungsdiagnose aufzunehmen. Die in derselben Veröffentlichung ver-

tretene Auffassung von bipolaren Einzelgeißeln bei einigen Spezies dieser Gattung wird 1960 von WILLIAMS widerrufen zugunsten bipolarer Geißelbüschel. Diese Ansicht wird 1961 durch WILLIAMS und CHAPMAN bestätigt. In weiteren Arbeiten nimmt WILLIAMS 1959 zu Problemen, die Spirillen betreffend, Stellung. Während sie sich 1959 (a) nochmals kritisch mit der Klassifizierung der Gattung Spirillum auseinandersetzt, berichtet sie in weiteren Veröffentlichungen über die Kernsubstanz (1959, b), sowie über Zellwachstum und Zellteilung (1959, c) bei Spirillum anulus. Ihrer hier vertretenen Ansicht des diffusen Zellwachstums wird 1967 durch WAGNER widersprochen, der mit Hilfe fluoreszierender Antikörper bei Spirillum serpens verschiedene Wachstumszonen in der Zellwand nachweist, und der damit BISSET's Theorie (1951, 1953) der Wachstumspunkte bestätigt. In weiteren elektronenmikroskopischen Untersuchungen befaßt sich BISSET (1960) mit dem Blepharoplasten bei Spirillum serpens und zusammen mit PEASE (1960) mit der Zellstruktur großer Spirillen.
RITTENBERG und RITTENBERG kommen 1962 nochmals auf das Wachstum von Spirillum volutans in Mischkulturen zurück. 1963 schlägt MARTINEZ in einer Arbeit über die Zelleinschlüsse bei dem Genus Spirillum vor, den Ausdruck "Volutin" zugunsten "metachromatischer Granula" fallen zu lassen. KOLENBRANDER nimmt 1968 zu dem Problem des chemischen Aufbaus der Zellwand bei Spirillum serpens Stellung.
Mit der Erarbeitung serologischer Untersuchungsmethoden sind der systematischen Bakteriologie neue Möglichkeiten eröffnet worden, eine weitere Differenzierung von Bakterien vorzunehmen. Deutlich ist das in der Salmonella-Forschung zu sehen. Hier können im KAUFFMANN-WHITE-Schema heute schon über 1000 verschiedene Salmonellen-Spezies nach ihrem Antigenaufbau unterschieden werden.
In der Spirillen-Literatur finden sich nur wenige Hinweise auf serologische Untersuchungen. 1952 berichten PIJPER, CROCKER, VAN DER WALT und SAVAGE über spezifische Agglutinationen bei Spirillum serpens. Sie konnten durch Zugabe verschiedener Seren zu homologen Antigenen spezifische

Agglutinationen erzielen. Die Seren waren durch Immunisierung von Kaninchen mit lebenden Spirillen, bei 56° C abgetöteten und solchen, die 2 Stunden im strömenden Dampf behandelt worden waren, gewonnen worden. Außerdem behandelten sie Spirillen mit einer Tuschesuspension und führten anschließend durch Zugabe homologer Seren Agglutinationen durch. Sie kamen zu dem Ergebnis, daß das Spirillum serpens ein hitzestabiles und ein hitzelabiles Antigen besitze. Beide Antigene seien in einem Schleimmantel gelegen, der das Bakterium umgibt und welcher eine Affinität zu den Tuschepartikeln aufweise. Durch Erhitzen auf 56° C ziehe sich dieser Schleimmantel zurück und mache so die Spirillen inagglutinabel. Weiter stellten sie fest, daß die Geißeln im Gegensatz zu denen der Salmonellen an der Agglutination nicht teilnehmen. BUNDSCHU untersucht 1963 die serologische Verwandtschaft zweier Spirillenstämme, die von GAISSMAIER (1963) als Spirillum serpens var. serpens und Spirillum serpens var acurvatum (var.nov.) identifiziert wurden. BUNDSCHU (1963) konnte mit Hilfe spezifischer Seren und aufgrund der kreuzweisen Absorption nach CASTELLANI (1902) die serologische Identität dieser Stämme aufzeigen. Außerdem konnte er serologische Beziehungen zu 3 weiteren Spirillenstämmen nachweisen.

Da sich im Schrifttum wenig Angaben über die antigenen Eigenschaften der Spirillen finden, sollten in dieser Arbeit folgende Fragen untersucht werden:

1. Lassen sich bei Stämmen der Gattung Spirillum analog zu den Salmonellen O- und H- Antigene nachweisen?

2. Bestehen bei verschiedenen Spezies dieser Gattung Gemeinsamkeiten im O- oder H- Antigen?

3. Liegt bei bestehender Gemeinsamkeit im O- Antigen verschiedener Stämme eine serologische Identität vor?

Die Untersuchungen wurden mit verschiedenen Stämmen aus der Spirillensammlung des Hygiene-Instituts Tübingen durchgeführt. Als Untersuchungsmethoden wurden vorwiegend die Reagenzglasagglutination, die indirekte Hämagglutination, die Latex-Geißel-Agglutination (BADER, 1964) sowie der Castellani'sche Absättigungsversuch herangezogen.

E I G E N E U N T E R S U C H U N G E N

I M A T E R I A L

1. Stämme und Antigene:

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Bakterienstämme kommen aus einer Spirillen-Sammlung des Hygiene-Instituts Tübingen.
Es handelt sich um folgende Stämme:

1. Stamm Nr. 8658 Spirillum serpens var. serpens
2. Stamm Nr. 8997 Spirillum serpens
3. Stamm Nr. 8998 Spirillum serpens
4. Stamm Nr. 9010 Spirillum sinuosum
5. Stamm Nr. 9011 Spirillum serpens var. azotum
6. Stamm Nr. 9070 Spirillum itersonii var. itersonii
7. Stamm Nr. 9071 Spirillum itersonii var. vulgatum
8. Stamm Nr. 9073 Spirillum giesbergeri
9. Stamm Nr. 9078 Spirillum serpens

In der weiteren Arbeit werden nur noch die Stammnummern aufgeführt.

Antigene:

a) OH Antigene:

Zweitägige auf 1,65 %igem Nähragar gewachsene Kulturen wurden mit physiologischer Kochsalzlösung abgeschwemmt und bis zu leichter Opaleszenz verdünnt. Diese Antigensuspensionen wurden im Reagenzglas mit entsprechenden Seren angesetzt.

b) O-Antigene:

Zur Gewinnung von O-Antigenen wurden die Suspensionen
2 1/2 Stunden bei 100° C im Dampftopf erhitzt,
bei - 20° C eingefroren oder
eine Aufschwemmung in reinem 96 %igem Alkohol hergestellt.

Diese Antigene wurden anschließend im Reagenzglas mit homologen OH-Seren versetzt. Das für die indirekte Hämagglutination sowie das für die Latex-Geißel-Agglutination verwendete Antigen wird bei den entsprechenden Methoden beschrieben.

2. Seren:

a) OH-Seren:

Die agglutinierenden Seren wurden durch Immunisierung von Kaninchen mit den entsprechenden OH-Antigenen hergestellt. Die Antigene wurden 5 mal jeweils im Abstand von 4 Tagen, beginnend mit 0,3 ml, dann 0,5 ml, 0,8 ml, 0,8 ml, 1,0 ml, in eine Ohrrandvene der Kaninchen injiziert. 4 Tage nach der letzten Antigengabe wurden die Tiere entblutet.

b) H-Seren:

Die abgesättigten H-Seren wurden nach der aus der Salmonellaserologie bekannten Absorptionsmethode CASTELLANI's (1902) hergestellt.

Zur Gewinnung des für die Absorption benötigten Antigens wurden jeweils Bakterien eines Stammes von Schrägagar auf 40 Kolle-Flaschen überimpft und 2 Tage bei 22° C gezüchtet. Anschließend wurde mit je 5 ml physiologischer Kochsalzlösung abgeschwemmt und 1 Stunde bei 3 000 U/Min. zentrifugiert. Das Sediment wurde 2 1/2 Stunden auf 100° C erhitzt. Dieses Antigen wurde mit 4 ml physiologischer Kochsalzlösung versetzt und durch Zugabe von 1 ml des zu absorbierenden Serums auf 1:5 verdünnt. Zur Bindung wurde dieses Gemisch 5 Stunden bei 37° C im Brutschrank belassen und anschließend 1 Stunde bei 3 500 U/Min. zentrifugiert. Der Überstand, das abgesättigte H-Serum, wurde abpipettiert.

3. Latex:

Zur Anlagerung von Geißeln wurde eine Latexsuspension (Hyland Laboratories, Los Angeles) mit einer Partikelgröße von 0,81 micron benutzt. Als Verdünnungsflüssigkeit diente physiologische Kochsalzlösung mit Tween 80, 1: 1 000.

4. Erythrocyten:

Für die indirekte Hämagglutination wurden aus defibriniertem Blut gewonnene Hammelerythrocyten verwendet, die 3 mal in physiologischer Kochsalzlösung gewaschen und anschließend 10 Minuten lang bei 2 000 U/Min. zentrifugiert worden waren. Das Sediment wurde mit physiologischer Kochsalzlösung auf 1:500 verdünnt.

II METHODEN

1. Voruntersuchungen:

In der Salmonellaserologie werden folgende Voraussetzungen für die Herstellung von Antigenen für serologische Untersuchungen gefordert:

a) Reinheit der Kulturen
b) Beweglichkeit der Keime
c) Vorliegen von Glattformen

Für die serologischen Untersuchungen der Spirillen wurden die Forderungen der Salmonellaserologie übernommen. Sie bildeten die Grundlage für die weiteren Untersuchungen.

ad a) Da nur geprüfte Einzelkolonien überimpft wurden, war eine Reinheit der Kulturen gewährleistet. Die Keime waren auf 1,65 %igem Nährschrägagar bei optimalem pH und optimalen Temperaturen gezüchtet worden.

ad b) Die Beweglichkeitsprüfung der einzelnen Stämme wurde im hängenden Tropfen unter dem Mikroskop vorgenommen. Je nach der Intensität der Beweglichkeit erfolgte die Bewertung +, ++, +++.

ad c) In der Salmonellaserologie wird zwischen der morphologischen und der serologischen Rauh- und Glattform unterschieden. Morphologische Untersuchungen wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht vorgenommen. Zur Bestimmung der serologischen Rauh- bzw. Glattform wurden als Stabilitätsproben
das Verhalten der Bakterien in physiologischer und in 3,5 %iger Kochsalzlösung und
das Verhalten in Trypaflavinlösung 1: 5 000 herangezogen. Die Stabilitätsproben wurden mit Hilfe der Objektträgeragglutinationen vorgenommen.

2. Hauptuntersuchungen:

a) Reagenzglasagglutination

α) OH-Agglutination:

Von den Seren wurden in Mengen von jeweils 0,5 ml Verdünnungsreihen, ausgehend von einer Anfangsverdünnung 1:50 hergestellt, zu der dann jeweils das homologe Antigen in gleicher Menge gegeben wurde. Die Reagenzglasagglutinationen wurden im Wasserbad bei 52° C durchgeführt. Um durch ständige Bewegung der Wassersäule im Reagenzglas eine rasche Agglutination zu erzielen, wurden nach der Methode von FELIX und GARDENER (1937) nur die Röhrchenkuppen ins Wasser getaucht. Abgelesen wurde nach 12 Stunden. Die positiven Reaktionen wurden angegeben. Zunächst kamen als Antigene 3 Stämme zur Anwendung, von denen OH-Antigene hergestellt worden waren (siehe I, 1b). In weiteren Untersuchungen wurden Bakterienaufschwemmungen verwendet, wie sie als OH-Antigene unter I, 1 a beschrieben wurden.

β) H-Agglutination:

Von den abgesättigten H-Seren (siehe I, 2b) wurden in Mengen von jeweils 0,5 ml Verdünnungsreihen, ausgehend von einer Anfangsverdünnung 1:50 hergestellt, zu der jeweils OH-Antigen in gleicher Menge gegeben wurde. Parallel zu jeder Reihe mit OH-Antigen wurde eine Kontrollreihe mit dem O-Antigen desselben Stammes hinzugefügt. Außerdem wurde jeder Verdünnungsreihe ein Kontrollröhrchen beigegeben, in dem das Serum durch physiologische Kochsalzlösung ersetzt worden war.

b) Indirekte Hämagglutination

Die Reaktion der indirekten Hämagglutination wurde in Anlehnung an die Methode durchgeführt, wie sie am Tübinger Hygiene-Institut angewandt wird (KIENINGER, 1964). Die Methode beruht auf der Entdeckung KEOGH's, NORTH's und WARBURTON's (1947), daß gelöste Antigene an Erythro-

cyten angelagert und durch die entsprechenden homologen Seren agglutiniert werden können.
Auf 1,65 %igem Nähragar in (gewöhnlich 10) Kulturschalen nach Kolle (Durchmesser 13 cm) gezüchtete Bakterien wurden mit je 5 ml physiologischer Kochsalzlösung abgeschwemmt und 1 Stunde im Autoklaven bei 120° C behandelt. Anschließend wurde 1 Stunde lang bei 3 000 U/Min. zentrifugiert. Mit dem Überstand, der die gelösten O-Antigene enthalten sollte, wurde weitergearbeitet. Zur Sensibilisierung der gewaschenen, im Verhältnis 1:500 verdünnten Erythrocyten (siehe I,4) wurde das Erythrocyten-Antigengemisch (Verhältnis 1:1) 1/2 Stunde bei 37° C ins Wasserbad verbracht. Anschließend wurde, zur Entfernung überschüssigen Antigens, die Suspension in physiologischer Kochsalzlösung insgesamt 3 mal gewaschen und bei 3 000 U/Min. kurz zentrifugiert. Zur Bestimmung des Agglutinintiters wurde eine Serumverdünnung (in WAR-Reagenzgläsern) beginnend mit einer Anfangsverdünnung von 1:50 hergestellt, zu der die Erythrocyten-Antigensuspension in gleichen Mengen gegeben wurde. Eine Kochsalzkontrolle wurde hinzugefügt. Die Gemische wurden 1/2 Stunde bei 37° C im Wasserbad belassen und anschließend 3 Minuten bei 3 000 U/Min. zentrifugiert. Die Ablesung erfolgte makroskopisch, indem jedes Röhrchen mit dem Finger angetippt wurde, um die abzentrifugierten Erythrocyten zu beobachten. Der Reaktionsausfall wurde mit +, ++, +++, bewertet, wobei +, ebenso wie eine schlierige Agglutination in der Verdünnung 1:50 nicht berücksichtigt wurde.
Zur Bestimmung des Antigentiters wurde mit einer Anfangsverdünnung des Antigengemisches von 1:2 begonnen. Dann wurde das Serum mit 1:10 verdünnt hinzugegeben und in der gleichen Weise wie oben beschrieben verfahren.

c) Latex-Geißel-Agglutination
Mit Hilfe der Latex-Geißel-Agglutination (BADER, 1964) läßt sich in der Salmonellaserologie nach entsprechender Versuchsanordnung eine spezifische H-Antigen-Antikörper-

reaktion erzielen. Ein weiterer Vorteil liegt darin, daß diese Reaktion die "Bestimmung der H-Antigene spontanagglutinabler Stämme" (BADER 1964) ermöglicht.
Das Prinzip besteht darin, im Homogenisator separierte Geißeln an Latexpartikel anzulagern und durch Zugabe eines homologen Serums eine H-Agglutination zu bewirken (BADER 1964). Es wurde folgendermaßen vorgegangen: auf 1,65 %igem Nähragar in Kulturschalen nach Kolle (Durchmesser 13 cm) gezüchtete Bakterien wurden mit je 5 ml physiologischer Kochsalzlösung abgeschwemmt und die Suspension 1 Stunde bei 3 000 U/Min. zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das Sediment wurde mit physiologischer Kochsalzlösung 1:25 verdünnt. Das Abtrennen der Geißeln vom Bakterienkörper erfolgte in einem Homogenisator (Fa.Bühler, Tübingen) durch 1 Minute langes Behandeln bei 20 000 - 30 000 U/Min.. Anschließend wurde 1 Stunde lang bei 3 000 U/Min. zentrifugiert. Wie BADER (1964) elektronenoptisch nachweisen konnte, befinden sich im Überstand so behandelter Salmonellenstämme die abgetrennten Geißeln. Zur Geißelanlagerung wurde zu einem Tween-Kochsalz-Latex-Gemisch (1 ml Latex auf 10 ml Tween-Kochsalz) zu gleichen Teilen der Überstand gegeben und 1 Stunde ins Wasserbad bei 37° gebracht. Das Latex-Geißel-Gemisch wurde dann nach Zugabe eines Serums 4 Stunden lang zur Agglutination im Wasserbad bei 37° C belassen und anschließend 1 Minute bei 3 000 U/Min. zentrifugiert. In der Serumverdünnungsreihe, beginnend mit einer Anfangsverdünnung von 1:50, wurde der Agglutinationstiter abgelesen. Nach demselben Verfahren wurde mit einer Antigenverdünnungsreihe ausgehend von einer Anfangsverdünnung von 1:2, ein optimaler Antigentiter ermittelt.

d) Absorptionen

In der Salmonellaserologie bietet die kreuzweise Absorption nach CASTELLANI interessante Einblicke in den Antigenbestand der Bakterien. Mit ihrer Hilfe gelingt es, Partialantigene zu identifizieren, aufgrund derer sich Rück-

schlüsse auf die serologische Verwandtschaft verschiedener Spezies ziehen, sowie ihre exakte systematische Einordnung vornehmen lassen. Ihr Prinzip besteht darin, daß agglutinierende Seren,die mit den zu vergleichenden Stämmen hergestellt worden waren, jeweils mit dem heterologen Stamm zur Absorption versetzt werden und anschließend durch Zugabe des homologen Stammes geprüft wird, ob eine vollständige Absorption stattgefunden hat. Sind in den Seren noch Restagglutinine vorhanden, deutet dies auf einen Unterschied im Antigenbestand der beiden Stämme hin.

Die zur Absorption benötigten Bakterien wurden jeweils auf 1,65 %igem Nähragar in je 12 Kulturschalen nach Kolle (Durchmesser 13 cm) während ca. 60 Stunden bei 22° C gezüchtet. Anschließend wurden diese abgeschwemmt und die Suspensionen 1 Stunde bei 3 000 U/Min. zentrifugiert. Dem Sediment wurden dann 5 ml eines 1:50 verdünnten heterologen Serums zugefügt und die Mischung mit einem Glasstab verrührt. Das zur Bindung 12 Stunden bei 37° C im Brutschrank gehaltene Gemisch wurde anschließend zentrifugiert und das überstehende Serum abpipettiert. Dieses wurde mit dem homologen Antigen und zur Kontrolle mit dem zur Absorption verwendeten Antigen in der indirekten Hämagglutination angesetzt. Trat mit dem zur Absorption verwendeten Antigen eine Agglutination ein, mußte der Absättigungsversuch wiederholt werden.

III E R G E B N I S S E

1. Voruntersuchungen

a) Beweglichkeit

Die Prüfung auf Beweglichkeit der verwendeten Stämme erfolgte im hängenden Tropfen unter dem Mikroskop. Die Keime waren auf 1,65 %igem Nähragar gewachsen. Die Geschwindigkeit war unterschiedlich. Mit +++ konnten bewertet werden:

Stamm Nr. 8658	+++
Stamm Nr. 8998	+++
Stamm Nr. 9011	+++
Stamm Nr. 9070	+++
Stamm Nr. 9071	+++
Stamm Nr. 9073	+++

Diese Stämme waren sehr gut beweglich.

Stamm Nr. 8997 wurde mit ++ bewertet.

Schwach beweglich waren folgende Stämme:

Stamm Nr. 9010	+
Stamm Nr. 9078	+

Hier war auch die Geschwindigkeit mit der sich die Bakterien fortbewegten erheblich geringer als in der ersten Gruppe mit +++.

b) Stabilitätsproben

Mit den Stabilitätsproben wurde untersucht, ob Spirillenstämme in der serologischen Rauh- oder Glattform vorlagen. Da diese Untersuchungen orientierenden Charakter hatten, wurden hierzu nur 4 Stämme herangezogen, deren Auswahl willkürlich war. Die Proben wurden auf Objektträgern vorgenommen. Das Verhalten der Stämme wurde in physiologischer und 3,5 %iger Kochsalzlösung beobachtet. Bei negativer Reaktion in den ersten beiden Lösungen wurde noch das Verhalten in Trypaflavin 1: 5 000 geprüft (siehe Tabelle 1).

Stamm Nr.	NaCl 0,85 %ig	NaCl 3,5 %ig	Trypaflavin 1: 5 000
8997	ø	+	
8998	++	++	
9070	ø	(±)	+
9071	ø	(±)	+

Tabelle 1: Das Verhalten verschiedener Spirillenstämme in 0,85 %iger und in 3,5 %iger Kochsalzlösung sowie in Trypaflavin 1: 5 000.

Die Stämme zeigten in den verschiedenen Lösungen ein unterschiedliches Verhalten. Während alle Stämme in 3,5 %iger Kochsalzlösung mehr oder weniger stark Spontanagglutination zeigten, fand sich diese in physiologischer Kochsalzlösung nur bei Stamm Nr. 8998. Soll eine Bewertung dieser Reaktionen erfolgen, so muß auf die Serologie der Salmonellen verwiesen werden. Hier wird die serologische Rauhform als eine Minus-Variante der serologischen Glattform bezeichnet, die den O-spezifischen Charakter verloren hat (KAUFFMANN, 1961). Durch den Verlust bestimmter hydrophiler Polysaccharide, die Träger der serologischen O-Spezifität im Protein-Polysaccharid-Lipoidkomplex sind, wird das labile Verhalten in Lösungen erklärt. Labilität in 0,85 %iger und 3,5 %iger Kochsalzlösung gilt als Kriterium für das Vorliegen serologischer Rauhform. Ein weiteres Merkmal ist das Verhalten in Trypaflavin. Eine positive Reaktion kann als ein zusätzliches Zeichen für das Vorliegen der serologischen Rauhform gewertet werden. Nach SERTIC und BOULGAKOV (1936), HIRSCH (1937), KAUFFMANN (1937), und GIOVANARDI (1938) ist jedoch diese Reaktion unsicher, da eine Spontanagglutination in Trypaflavin außer bei Rauhformen noch zu finden ist bei bestimmten glatten Salmonellenstämmen,

die das Vi-Antigen besitzen, bei der beta-Phase der Typhusbakterien sowie bei bestimmten unspezifischen Phasen.

In Tabelle 1 findet sich bei Stamm Nr. 8998 eine Ausflockung in physiologischer und 3,5 %iger Kochsalzlösung. Das bedeutet, daß dieser Stamm in der Rauhform vorlag. Stamm Nr. 8997 zeigte eine negative Reaktion in 0,85 %iger und eine positive in 3,5 %iger Kochsalzlösung, während Stamm Nr. 9071 und 9070 eine Stabilität in physiologischer, und eine nicht sicher positive Reaktion in 3,5 %iger Kochsalzlösung aufwiesen. Diese letzteren waren in Trypaflavin 1: 5 000 ausgeflockt. Eine sichere Beurteilung, ob die Stämme Nr. 8997, 9070 und 9071 in der serologischen Glatt- oder Rauhform vorliegen, kann nicht gegeben werden. Das Ausbleiben einer Agglutination in physiologischer Kochsalzlösung jedoch rechtfertigt die Annahme serologischer Glattformen. In der Reagenzglasmethode wurden deshalb Stämme, die in den Kontrollröhrchen mit 0,85 %iger Kochsalzlösung keine Agglutination zeigten, als serologische Glattformen gewertet.

2. Hauptuntersuchungen

a) Reagenzglasagglutinationen

α) OH-Agglutination mit homologen und heterologen Seren

Mit der Reagenzglasmethode wurden 3 Stämme sowohl mit homologem als auch heterologem Serum versetzt. Es sollte untersucht werden, ob Antigengemeinschaften zwischen verschiedenen Stämmen bestehen, d.h. ob die Stämme durch heterologe Seren agglutiniert werden können. Da diese Untersuchung orientierenden Charakter hatte, wurden die Serumverdünnungsreihen bis 1:400 hergestellt. Agglutinationen wurden mit + angegeben. Die Ergebnisse sind in Tabelle 2 zusammengefaßt.

OH-Serum	OH-Stamm 8998	9070	9071
8998	>400		
9070	>400	>400	
9071	>400	>400	>400
NaCl	ø	ø	ø

Tabelle 2: Antigen-Antikörperreaktion in der Reagenzglasmethode mit homologen und heterologen Seren.

Die Ergebnisse der Tabelle 2 zeigen Agglutinationen der drei Stämme mit ihrem homologen Serum. Zwei Stämme wurden durch heterologe Seren agglutiniert. Serum 9070 zeigte mit Stamm Nr. 8998, Serum 9071 mit Stamm Nr. 8998 und mit Stamm Nr. 9070 eine Antigen-Antikörperreaktion. Dies bedeutet bei der Annahme von O- und H-Antigenen bei den Spirillen, daß entweder im O- und im H-Antigen oder im O- oder im H-Antigen gemeinsame serologische Faktoren vorhanden sind.

β) Einfluß physikalischer und chemischer Faktoren auf die Antigene.

Zunächst wurde mit der Reagenzglasmethode bei 2 Stämmen der Einfluß physikalischer und chemischer Faktoren auf die Antigene untersucht. Hierzu waren die Stämme bei 100° C 2 1/2 Stunden gekocht, bei - 20° eingefroren und in 96 %igem Alkohol aufgeschwemmt worden. Zum Vergleich wurde in einer weiteren Reihe jeweils der unbehandelte Stamm angesetzt. Den OH-Seren wurden die homologen Antigene hinzugegeben und in einer absteigenden Serumverdünnungsreihe der jeweilige Serumendtiter ermittelt (siehe Tabelle 3).

Antigen	OH-Serum	Serumtiter
8998 OH	8998	1: 25 600
8998 100° C	8998	1: 800
8998 -20° C	8998	1: 6 400
8998 Alkohol	8998	1: 800
9070 OH	9070	1: 1 600
9070 100° C	9070	1: 400
9070 -20° C	9070	1: 800
9070 Alkohol	9070	1: 400

NaCl-Kontrollen waren negativ.

Tabelle 3: Reagenzglasagglutination verschieden behandelter Antigene, angesetzt mit dem jeweiligen homologen Serum.

Wie Tabelle 3 zeigt, blieb die Agglutinabilität der behandelten Bakterien erhalten. Im Vergleich zu den unbehandelten Bakterien lagen bei den behandelten die Serumtiter niedriger. Einfrieren bei -20° C verringerte die Titerstufen am wenigsten. Eine deutliche Herabsetzung der Serumtiter (d.h. eine höhere Konzentration des Serums, bei der noch eine sichtbare Agglutination eintritt) war bei den Antigenen zu beobachten, die in 96 %igem Alkohol aufgeschwemmt und bei denen, die 2 1/2 Stunden bei 100° C erhitzt worden waren. Dies deutet darauf hin, daß, analog zu den Salmonellen, durch Erhitzen und durch Behandeln mit absolutem Alkohol die H-Antigene ihre Agglutinabilität verloren.

γ) H-Agglutinationen

Mit Hilfe abgesättigter H-Seren wurde versucht, H-Agglutinationen zu erzielen. In verschiedenen Serumverdünnungsreihen wurden H-Seren mit OH-Antigenen und H-Seren mit O-Antigenen versetzt. Zum Vergleich wurden zwei weitere Reihen von OH-Seren jeweils mit dem homologen OH-Antigen und O-Antigen versetzt. In Tabelle 4 wird dies an Stamm Nr. 8998 dargelegt. Wie schon in den vorausgegangenen Versuchen mit der Reagenzglasmethode wurde auch hier jeder Verdünnungsreihe ein Kontrollröhrchen beigegeben, in dem das Serum durch physiologische Kochsalzlösung ersetzt worden war.

Stamm Nr. 8998	Serum 8998	Serumtiter	NaCl
OH-Antigen	H-Serum	1: 3 200	ø
O-Antigen (K)	H-Serum	negativ	ø
OH-Antigen	OH-Serum	1: 6 400	ø
O-Antigen	OH-Serum	1: 6 400	ø

Tabelle 4: Serumtiter homologer H-, OH- und O-Agglutinationen von Stamm Nr. 8998.
K = Kontrolle

Bei allen Versuchen mit der Reagenzglasmethode fiel auf, daß mit steigender Zahl der Versuche die anfangs selten auftretenden Spontanagglutinationen zunahmen. Am auffälligsten war dies in der Versuchsreihe mit H-Seren. Es ist anzunehmen, daß infolge häufigen Überimpfens die Stämme in die Rauhform übergegangen waren. Stamm Nr. 8998 war deshalb direkt vom Originalstamm überimpft und zur H-Agglutination herangezogen worden. Eine Spontanagglutination blieb aus.

Wie Tabelle 4 zeigt, ist mit Stamm Nr. 8998 eine H-Agglutination möglich. Die Kontrollreaktion, H-Serum mit dem O-Antigen versetzt, war negativ.
Wegen der häufig auftretenden Spontanagglutinationen mit der Reagenzglasmethode wurde deshalb diese Versuchsreihe abgebrochen. Mit Hilfe der spezifischen O- und H-Agglutination in der indirekten Hämagglutination und in der Latex-Geißel-Agglutination sollte die Frage der O- und H-Antigene bei verschiedenen Spirillenstämmen geklärt werden.

b) Indirekte Hämagglutination

In der Salmonellaserologie lassen sich mit dieser Methode spezifische O-Antigen-Antikörperreaktionen erzielen. Analog hierzu sollte die Möglichkeit der spezifischen O-Agglutination bei den Spirillen untersucht werden.
Nach entsprechender Vorbereitung (siehe II, 2 b) wurden verschiedene Erythrocyten-O-Antigen-Komplexe mit OH-Seren versetzt. In Vorversuchen waren jeweils die optimalen Antigen- und Serumverdünnungen ermittelt worden. Zur Antigen- und Serumkontrolle wurden jeder Reihe 2 Röhrchen beigegeben. Im ersten Röhrchen war das Serum durch physiologische Kochsalzlösung, im zweiten Röhrchen war der Erythrocyten-Antigen-Komplex durch ein Erythrocyten-Kochsalzgemisch ersetzt worden. Die zusammenfassenden Ergebnisse finden sich in Tabelle 5.

Serum	O-Antigen 8658	9011	8998	8997	9010	9073	9078	9070	9071
8658	1:3200	1:1600	1:6400	1:3200					
9011	1:400	1:6400	1:1600	1:800					
8998	1:200	1:1600	1:3200	1:800					
8997	1:200	1:6400	1:800	1:800					n.u.
9010					1:3200	1:3200	1:100		n.u.
9073					1:800	1:3200	(1:50)		n.u.
9078					1:100	1:400	1:6400		n.u.
9070								1:3200	
9071				n.u.	n.u.	n.u.			1:400

Serum- und Antigenkontrollen waren negativ.

Tabelle 5: Indirekte Hämagglutination 9 verschiedener O-Antigene mit den homologen und heterologen OH-Seren.

Homologe Antigen-Antikörperreaktionen sind unterstrichen.
n.u. = nicht untersucht.

Wie aus Tabelle 5 ersichtlich ist, sind mit der Methode der indirekten Hämagglutination O-Antigen-Antikörperreaktionen bei Spirillenstämmen möglich. Weiterhin zeigte sich eine serologische Verwandtschaft in den O-Antigenen verschiedener Stämme. Über ihren Grad kann aufgrund dieser Versuche keine Aussage gemacht werden. Diese Frage sollte mit der Methode der kreuzweisen Absorption untersucht werden.

c) Latex-Geißel-Agglutination.

Mit Hilfe dieser Methode läßt sich in der Salmonella-serologie eine spezifische H-Antigen-Antikörperreaktion erzielen. Es sollte geprüft werden, ob die Spirillen H-Antigene besitzen und ob eine spezifische H-Agglutination möglich ist (Methode siehe II, 2 c).
Zunächst wurden zu einem Vorversuch 3 Stämme herangezogen, deren Latex-Geißelkomplexe mit den homologen Seren versetzt wurden. In Serum- und Antigenverdünnungsreihen wurden jeweils die Titer bestimmt. In der Serumverdünnungsreihe fanden sich folgende Titer:

Latex-Geißel-Suspension (H-Antigen)	OH-Serum	Serum-Titer
8998	8998	1:3200
9070	9070	1:1600
9071	9071	1:3200

Tabelle 6: Serumtiter in der Latex-Geißel-Agglutination

Die Antigenverdünnungsreihen ergaben folgende Titer:

Latex-Geißel-Suspension (H-Antigen)	OH-Serum	Antigen-Titer
8998	8998	1:64
9070	9070	1:32
9071	9071	1:32

Tabelle 7: Antigentiter in der Latex-Geißel-Agglutination

In weiteren Versuchen wurden 9 verschiedene H-Antigene mit den homologen und heterologen Seren zur Agglutination angesetzt. In Vorversuchen hatte sich gezeigt, daß optimale Reaktionen mit unverdünnten Latex-Geißel-Suspensionen zu erzielen waren. In den zur Antigenkontrolle beigefügten Röhrchen war jeweils das Serum, in den zur Serumkontrolle beigegebenen Röhrchen das Antigen durch 0,85 %ige Kochsalzlösung ersetzt worden. Die Ergebnisse sind in Tabelle 8 zusammengefaßt.

OH-Serum	Latex-Geißel-Suspension (H-Antigen) 8658	9011	8998	8997	9010	9073	9078	9070	9071
8658	1:1600	1:100		1:200					n.u.
9011	(1:50)	1:6400	1:1600	1:1600					
8998		1:100	1:3200	1:1600					
8997	1:200	1:400	1:800	1:800					
9010					1:400	1:200	1:100		n.u.
9073					1:100	1:200			n.u.
9078					1:100		1:1600		n.u.
9070								1:1600	
9071	n.u.				n.u.	n.u.	n.u.	(1:50)	1:200

Serum- und Antigenkontrollen waren negativ.

Tabelle 8: Latex-Geißel-Agglutination 9 verschiedener Stämme mit homologen und heterologen Seren.

Homologe Antigen-Antikörperreaktionen sind unterstrichen.
n.u. = nicht untersucht.

Wie Tabelle 8 zeigt, besitzen die Spirillen H-Antigene. Eine spezifische H-Antigen-Antikörperreaktion ist möglich. Im H-Antigen zeigen sich, ähnlich wie im O-Antigen, Gemeinsamkeiten bei verschiedenen Stämmen. Untersuchungen über den Grad der serologischen Verwandtschaft im H-Antigen verschiedener Spirillenstämme mit Hilfe der kreuzweisen Absorption wurden in dieser Arbeit nicht vorgenommen.

d) Absorptionen

Aus Tabelle 5 ist ersichtlich, daß bei verschiedenen Spirillenstämmen eine serologische Verwandtschaft im O-Antigen besteht. In den folgenden Untersuchungen sollte mit Hilfe der kreuzweisen Absorption nach CASTELLANI versucht werden, einige Aufschlüsse über den Grad der serologischen Verwandtschaft im O-Antigen zu erhalten. Es konnten hierbei nur einige Absättigungen durchgeführt werden, um einen prinzipiellen Einblick in die Arbeitsmöglichkeit mit dieser Methode bei Spirillen zu erhalten.
Eine Absättigung sämtlicher Seren aus der Tabelle 5 hätte den Rahmen dieser Arbeit gesprengt.
Es wurden OH-Seren mit den Stämmen absorbiert, die in der indirekten Hämagglutination durch diese Seren agglutiniert worden waren. Durch Zugabe der homologen und heterologen Stämme wurden die absorbierten Seren auf Restagglutinine geprüft. Die Ergebnisse sind in Tabelle 9 dargelegt.

Tabelle 9

OH-Serum	abgesättigt mit Stamm Nr.	angesetzt mit Stamm Nr.	Ergebnis
9010	9073	9073 (K)	ø
9010	9073	9010	ø
9073	9010	9010 (K)	ø
9073	9010	9073	ø
9010	9078	9078 (K)	ø
9010	9078	9010	1:800
9010	9078	9073	1:800
9078	9010	9010 (K)	ø
9078	9010	9078	1:3200
9078	9010	9073	ø
9010	9078 + 9073	9073 (K)	ø
9010	9078 + 9073	9078 (K)	ø
9010	9078 + 9073	9010	ø
8658	8998	8998 (K)	ø
8658	8998	8658	ø
8658	8998	8997	ø
8658	8998	9011	ø
8998	8658	8658 (K)	(H)
8998	8658	8998	ø
8998	8658	8997	ø
8998	8658	9011	1:1600

Tabelle 9: Ergebnis der kreuzweisen Absorptionen: Abgesättigte Seren, angesetzt mit homologen und heterologen Antigenen in der indirekten Hämagglutination.

Fortsetzung Seite 27

Fortsetzung Tabelle 9

OH-Serum	abgesättigt mit Stamm Nr.	angesetzt mit Stamm Nr.	Ergebnis
9011	8658	8658 (K)	(H)
9011	8658	9011	1:1600
9011	8658	8997	(H)
9011	8658	8998	(H)
8658	9011	9011 (K)	ø
8658	9011	8658	1:100
8658	9011	8997	ø
8658	9011	8998	1:400
8998	9011	9011 (K)	ø
8998	9011	8998	ø
8998	9011	8658	ø
8998	9011	8997	ø
9011	8998	8998 (K)	ø
9011	8998	9011	ø
9011	8998	8658	ø
9011	8998	8997	ø
8998	8997	8997 (K)	ø
8998	8997	8998	ø
8998	8997	8658	ø
8998	8997	9011	ø
8997	8998	8998 (K)	ø
8997	8998	8997	ø
8997	8998	8658	ø
8997	8998	9011	ø

Tabelle 9: Ergebnis der kreuzweisen Absorptionen: Abgesättigte Seren, angesetzt mit homologen und heterologen Antigenen in der indirekten Hämagglutination.

Fortsetzung Seite 28

Fortsetzung Tabelle 9

OH-Serum	abgesättigt mit Stamm Nr.	angesetzt mit Stamm Nr.	Ergebnis
9011	8997	8997 (K)	ø
9011	8997	9011	ø
9011	8997	8658	ø
9011	8997	8998	ø
8997	9011	9011 (K)	ø
8997	9011	8997	ø
8997	9011	8658	ø
8997	9011	8998	ø
8997	8658	8658 (K)	ø
8997	8658	8997	ø
8997	8658	8998	ø
8997	8658	9011	1:3200
8658	8997	8997 (K)	ø
8658	8997	8658	ø
8658	8997	8998	1:200
8658	8997	9011	ø

Tabelle 9: Ergebnis der kreuzweisen Absorptionen: Abgesättigte Seren, angesetzt mit homologen und heterologen Antigenen in der indirekten Hämagglutination.

(K) = Kontrolle
(H) = Hämolyse

Tabelle 9 gibt keinen vollkommenen Überblick über den Grad der serologischen Verwandtschaft im O-Antigen verschiedener Spirillenstämme. Sie läßt lediglich einige Rückschlüsse zu. Die O-Antigene von Stamm Nr. 9073 vermögen die O-Agglutinine von Serum 9010 völlig zu erschöpfen. Andererseits absorbiert

Stamm Nr. 9010 sämtliche O-Agglutinine von Serum 9073. Das bedeutet, daß Stamm Nr. 9073 und Nr. 9010 im O-Antigen nicht zu unterscheiden sind.
In dem durch Stamm Nr. 9078 abgesättigten Serum 9010 sind noch Restagglutinine vorhanden, die Stamm Nr. 9010 und Nr. 9073 agglutinieren. Ebenso liegt bei Serum 9078 absorbiert mit Stamm Nr. 9010 keine völlige Absättigung vor. Es tritt mit dem homologen Stamm noch eine Antigen-Antikörperreaktion ein. Dies besagt, daß die O-Antigene von Stamm Nr. 9010 und 9073 weitere Partialantigene besitzen als das O-Antigen von Stamm Nr. 9078. Die Agglutinine von Serum 8998 werden durch Stamm Nr. 9011 vollkommen absorbiert. Ebenfalls absorbiert Stamm Nr. 8998 das Serum 9011 völlig. Eine Agglutination mit anderen Stämmen tritt nicht ein. Weiter ist aus Tabelle 9 zu ersehen, daß Serum 8997 durch Stamm Nr. 8998 und das Serum 8998 durch Stamm Nr. 8997 völlig absorbiert wird. Dasselbe Ergebnis findet sich bei Serum 9011 absorbiert mit Stamm Nr. 8997 und Serum 8997 absorbiert mit Stamm Nr. 9011. Auch hier sind mit anderen Stämmen keine Immunreaktionen zu erzielen. Es läßt sich also feststellen, daß zwischen den Stämmen Nrr. 8997, 8998 und Nr. 9011 sehr enge Beziehungen bestehen. Eine serologische Identität muß jedoch aufgrund der weiteren Ergebnisse aus Tabelle 9 ausgeschlossen werden. Hier zeigt sich, daß Serum 8997 abgesättigt mit Stamm Nr. 8658 zwar mit Stamm Nr. 9011 eine Agglutination aufweist, nicht jedoch mit den Stämmen Nrr. 8998 und 9011. Ebenso zeigt das mit Stamm Nr. 8997 abgesättigte Serum 8658 nur mit Stamm Nr. 8998, nicht aber mit Stamm Nr. 9011 eine Antigen-Antikörperreaktion. Demgegenüber vermag das Serum 8658 absorbiert mit Stamm Nr. 8998, weder Stamm Nr. 8997 noch Nr. 9011 zu agglutinieren. Die in den Reaktionen des mit Stamm Nr. 8658 abgesättigten Serums 9011 auftretende Hämolyse kann nicht erklärt werden. Wiederholungen der Versuche zum Ausschluß anderer Fehlerquellen brachten dasselbe Ergebnis.

e) Agglutinationstypen.

Der Agglutinationstypus der Spirillen in der Reagenzglasagglutination unterschied sich von dem der Salmonellen. Während hier schon aufgrund einer körnigen oder flockigen Agglutination eine O- und H-Agglutination unterschieden werden kann, traten dort sowohl bei O- wie bei H-Agglutination vorwiegend klumpig-flockige Agglutinationen auf, nicht selten auch flockig-körnige. Eine Gesetzmäßigkeit war darin nicht zu erkennen. Beim Antippen der Röhrchenkuppe zerfielen die Agglutinate leicht. Häufig zeigte sich beim Aufschütteln die Bildung einer Schliere die fest mit dem Boden des Röhrchens verhaftet blieb. Diese Form wurde als Agglutination nicht gewertet.
Die Agglutinate der indirekten Hämagglutination waren denen aus der Salmonella-Serologie bekannten vergleichbar. Am Reagenzglasboden bildete sich ein dünnes Häutchen aus zusammengeballten Erythrocyten, die beim Anschlagen an das Röhrchen körnig-fetzig zerfielen. Demgegenüber waren die Agglutinate der Latex-Geißel-Agglutination mehr als flockig-klumpig zu bezeichnen, die beim Anschlagen leichter zerfielen.

IV D I S K U S S I O N

Die Erkenntnisse der Serologie der Salmonellen bildeten die Grundlage für die vorliegenden serologischen Untersuchungen bei den Spirillen.
Spirillen können wie Salmonellen in der serologischen Rauh- oder Glattform vorliegen. Wie Tabelle 1 zeigt, war von 4 willkürlich ausgewählten Stämmen ein Stamm (Nr.8998) in 0,85 %iger Kochsalzlösung spontan agglutinabel. In 3,5 %iger Kochsalzlösung zeigte ein Stamm (Nr.8998) eine eindeutige, zwei weitere Stämme (Nrr. 9070 und 9071) eine nicht sicher

positive Agglutination. Analog zur Salmonellenserologie wurden in den weiteren Untersuchungen Spontanagglutinationen der Spirillenstämme in physiologischer Kochsalzlösung mit dem Vorliegen serologischer Rauhformen erklärt. Mit zunehmender Zahl der Versuche konnte eine ansteigende Labilität der Antigene in physiologischer Kochsalzlösung beobachtet werden. Die Annahme, daß durch häufiges Überimpfen die Stämme in die Rauhform übergegangen waren, konnte dadurch bestätigt werden, daß Stamm Nr. 8998, der in wiederholten Versuchen eine Spontanagglutination in physiologischer Kochsalzlösung aufwies, nach Überimpfen vom Originalstamm in 0,85 %iger Kochsalzlösung stabil blieb.
Spirillen, die unterschiedlichen physikalischen und chemischen Einwirkungen unterworfen sind, behalten ihre Agglutinabilität. In Tabelle 3 traten nach Zugabe homologer OH-Seren zu Bakterien, die 2 1/2 Stunden auf 100° C erhitzt, bei - 20° C eingefroren und mit absolutem Alkohol behandelt worden waren, noch Agglutinationen ein. Die Serumtiter waren niedriger als bei Agglutinationen von unbehandelten Stämmen mit homologen OH-Seren. Am wenigsten beeinflußt wurden die Titer durch Einfrieren bei - 20° C. Durch Erhitzen auf 100° C und Aufschwemmen in 96 %igem Alkohol wurden die Serumtiter deutlich erniedrigt. Diese Ergebnisse zeigen, daß Spirillen O- und H-Antigene besitzen, die die gleichen Eigenschaften aufweisen wie die O- und H-Antigene der Salmonellen. Die Fähigkeit zu agglutinieren, trotz Erhitzen der Bakterien auf 100° C, beruht demnach wie in der Salmonella-Serologie auf der Hitzestabilität der O-Antigene. Als weiterer Beweis hierfür dient die indirekte Hämagglutination.
Das Vorliegen von H-Antigen, wie dessen Hitzelabilität konnte durch die in Tabelle 4 zusammengefaßten Ergebnisse gezeigt werden. Hier wurde mit Stamm Nr. 8998 eine H-Agglutination durchgeführt. Der lebende Stamm (OH-Antigen) wurde durch das homologe abgesättigte H-Serum agglutiniert. Der Agglutinintiter betrug 1:3200. Der abgetötete Stamm (O-Antigen), versetzt mit dem absorbierten H-Serum des-

selben Stammes, zeigte keine Reaktion.
In ihren Untersuchungen mit Spirillum serpens berichten PIJPER, CROCKER, VAN DER WALT und SAVAGE (1952) über hitzestabile O-Antigene und hitzelabile H-Antigene, welche in einem Schleimwall gelegen seien, der das Bakterium umgebe und der eine Affinität für Tuschepartikel besitze. Aufgrund der vorliegenden Untersuchungen kann die Annahme von hitzestabilen O-Antigenen und hitzelabilen H-Antigenen bei den Spezies der Gattung Spirillum bestätigt werden. Ob die O-Antigene in einem das Spirillum umgebenden Schleimwall (PIJPER, CROCKER, VAN DER WALT und SAVAGE) oder wie bei den Salmonellen im Bakteriensoma gelegen sind, bedarf noch der Prüfung.
Durch die klassische Untersuchungsmethode im Reagenzglas wurde grundsätzlich gezeigt, daß bei Spirillen serologische Reaktionen möglich sind. Verschiedene Stämme wurden sowohl in der OH-Agglutination, hier jeweils nur bis zu einem Titer 1:400, wie in der H-Agglutination geprüft. Wie aus Tabelle 2 ersichtlich ist, wurde jeder der zu diesen Versuchen herangezogenen Stämme durch sein homologes Serum agglutiniert. Außerdem zeigte Stamm Nr. 8998 noch mit den Seren 9070 und 9071 eine Antigen-Antikörperreaktion. Weiter wurde Stamm Nr. 9070 durch das heterologe Serum 9071 agglutiniert. Dies besagt, daß die Stämme Nrr. 8998 und 9070, sowie Nrr. 8998 und 9071 und Nrr. 9070 und 9071 in ihrer Antigenstruktur wenigstens ein gemeinsames Partialantigen besitzen. Diese gemeinsamen serologischen Faktoren können jeweils im O- und H- oder im O- oder H-Antigen verschiedener Stämme vorliegen.
Gezielte Untersuchungen über die O- und H-Antigene lassen sich mit der indirekten Häm- und mit der Latex-Geißel-Agglutination durchführen.
Mit der indirekten Hämagglutination zeigte sich, daß bei den Spirillen O-Antigen-Antikörperreaktionen möglich sind. Aus Tabelle 5 geht hervor, daß verschiedene O-Antigene nicht nur durch ihre homologen, sondern auch durch heterologe Seren agglutiniert werden können. Die Kreuzproben waren positiv.

Aufgrund der Untersuchungen läßt sich sagen, daß zwischen den Stämmen Nrr. 8658, 9011, 8998 und 8997 eine serologische Verwandtschaft im O-Antigen besteht. Es handelt sich hier um Spirillum serpens var. serpens (Nr.8658), Spirillum serpens (Nr. 8997), Spirillum serpens (Nr. 8998) und um Spirillum serpens var. azotum (Nr.9011). Diese 4 Stämme wurden durch die entsprechenden heterologen Seren dieser Gruppe agglutiniert. Die Tabelle 5 zeigt weiter, daß die Stämme Nrr. 9010, 9073 und 9078 Gemeinsamkeiten im O-Antigen aufweisen. Es handelt sich hier um Spirillum sinuosum (Nr. 9010), Spirillum giesbergeri (Nr.9073) und um Spirillum serpens (Nr.9078). Die gekreuzten Agglutinationen dieser Antigene mit den heterologen Seren waren positiv. Die Untersuchungen, deren Ergebnisse in Tabelle 5 dargelegt sind, zeigen zwar serologische Gemeinsamkeiten verschiedener Stämme auf, sie geben aber keine Auskunft über den Grad der Verwandtschaft. Genaueres könnte aufgrund kreuzweiser Absorptionen nach CASTELLANI gesagt werden. Die Absorptionen, die notwendig wären um den Grad der serologischen Verwandtschaft der in Tabelle 5 aufgeführten Stämme festzustellen, hätten jedoch den Rahmen dieser Arbeit gesprengt. Es wurden deshalb nur einige Absorptionen durchgeführt. Hier zeigte es sich, daß die Stämme Nr. 9010 und Nr.9073 in der Lage waren die O-Agglutinine der heterologen Seren der Stämme Nrr. 9010 und 9073 völlig zu absorbieren, während Serum 9078, gleichfalls mit diesen Antigenen abgesättigt, noch Restagglutinine aufwies. Aufgrund dieser Untersuchungen kann festgestellt werden, daß die O-Antigene von Spirillum sinuosum (Nr.9010) und Spirillum giesbergeri (Nr.9073) identisch sind. Über eine Kongruenz der H-Antigene kann keine Aussage gemacht werden, da die absorbierten Seren nicht mit der Latex-Geißel-Agglutination geprüft wurden. Nach Tabelle 8 kann aber ein gemeinsames H-Antigen bei beiden Stämmen festgestellt werden.

Spirillum sinuosum und Spirillum giesbergeri wurden nach eingehenden Untersuchungen von WILLIAMS und RITTENBERG (1957) als neue Spezies in die Gattung Spirillum EHRENBERG auf-

genommen. Nach Angaben WILLIAMS' und RITTENBERG's unterscheiden sich diese beiden Stämme vorwiegend durch ihre Zellänge. Während Spirillum giesbergeri größer als ein micron ist, liegt die Länge von Spirillum sinuosum unter einem micron. Aufgrund ihres Stoffwechsels ist nur ein geringer Unterschied darin zu sehen, daß Spirillum giesbergeri auf Kartoffelscheiben ein sehr schwaches, weißliches Wachstum zeigt, während Spirillum sinuosum sich auf Kartoffel nicht vermehrt. Außerdem liegt noch ein geringer Unterschied im tolerierten pH-Bereich.
Über die Identität der O-Antigene der Stämme Nrr. 8658, 8998, 8997 und 9011 können auch aufgrund der durchgeführten Absorptionen keine endgültigen Angaben gemacht werden. Nach den bisher vorliegenden Untersuchungen (siehe Tabelle 9) ist eine sehr enge serologische Verwandtschaft der O-Antigene der Stämme Nrr. 8998, 8997 und 9011 anzunehmen.
Wie Tabelle 8 zeigt, liegen auch in den H-Antigenen dieser zuletzt genannten Stämme gemeinsame serologische Faktoren vor. Da in der Latex-Geißel-Agglutination die abgesättigten Seren dieser Stämme nicht geprüft worden waren, kann über die serologische Verwandtschaft im H-Antigen keine endgültige Aussage gemacht werden. Im Gegensatz zum O-Antigen (siehe Tabelle 5) lassen sich im H-Antigen der Stämme Nr. 8658 und Nr. 8998 keine serologischen Beziehungen nachweisen. Wie aus Tabelle 8 weiter zu ersehen ist, besteht eine serologische Verwandtschaft im H-Antigen der Stämme Nrr.9010 und 9073 sowie Nrr. 9010 und 9078.
Bei der Latex-Geißel-Agglutination werden im Verlauf der Antigenaufbereitung die Geißeln vom Bakterienkörper separiert und anschließend an Latexpartikel angelagert. Zugabe homologer OH-Seren zu diesem Latex-Geißelgemisch bewirken spezifische H-Agglutinationen. Mit dieser Versuchsanordnung wird die Ansicht PIJPER's, CROCKER's, VAN DER WALT's und SAVAGE's (1952) widerlegt, die Geißeln nähmen an der Agglutination nicht teil und sie seien daher ähnlichen Strukturen bei den Salmonellen nicht gleichzusetzen.

Die vorliegenden Ergebnisse bestätigen die Untersuchungen BUNDSCHU's (1963), daß zwischen verschiedenen Stämmen der Gattung Spirillum serologische Beziehungen bestehen.

V Z U S A M M E N F A S S U N G

Serologische Untersuchungen an 9 Stämmen der Gattung Spirillum EHRENBERG ergaben folgende Ergebnisse:

1. Bei den Stämmen der Gattung Spirillum EHRENBERG lassen sich hitzestabile O- und hitzelabile H-Antigene nachweisen.

2. Bei verschiedenen Spezies dieser Gattung bestehen Gemeinsamkeiten sowohl im O- als auch im H-Antigen.

3. Bei 2 Stämmen fand sich eine serologische Identität der O-Antigene.

4. Die Resultate weisen auf die Möglichkeit hin, neben morphologischen und biochemischen Methoden die serologische Analyse zur Klassifizierung der Spirillen heranzuziehen.

L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

BADER, R.-E. — Die Latex-Geißel-Agglutination. Z.Hyg.Infekt.-Kr. 150, 199-210 (1964)

BEIJERINCK, M.W. — Über Atmungsfiguren beweglicher Bakterien. Zbl.Bakt.II.Abt. 14, 827-845, (1893)

\- — Über Spirillum desulfuricans als Ursache von Sulfatreduktion. Zbl.Bakt.II.Abt., 1, 1-3 (1895)

\- — Über ein Spirillum, welches freien Stickstoff binden kann. Zbl.Bakt.II.Abt. 63, 353-359 (1925)

BISSET, K.A. — The development of surface structures in dividing bacteria. J.Gen.Microbiol. 5, 155-158, (1951)

\- — Bacterial cell envelopes. Int.Congr.Microbiol. 6.th, Congr.,Rome, 9-23, (1953)

An observation upon the blepharoplast of Spirillum serpens. G.Microbiol. 8, 193-197 (1960)

BISSET, K.A. and PEASE, P. — Cellular structure of large Spirilla. J.Bact. 79, 612-614 (1960)

BUNDSCHU, H.-D.

Untersuchungen über die serologische Verwandtschaft von zwei Stämmen der Gattung Spirillum.

Med.Inaug.Diss.Tübingen, (1963)

CARTER, H.V.

(Über Spirillum minus) zit. nach Bergey's Manual

Sci.Mem.Med.Off., Army India, 3, 45 (1888)

CASTELLANI, A.

Die Agglutination bei gemischter Infektion und die Diagnose der letzteren.

Z.Hyg.Infekt.-Kr. 40, 1-9, (1902)

CHAPMAN, G.B. and KROLL, A.I.

Electron microscopy of Ultrathin sections of Spirillum serpens.

J.Bact. 73, 63-71, (1957)

COHN, F.

Untersuchungen über die Entwicklungsgeschichte mikroskopischer Algen und Pilze.

Nova Acta Acad.Caes.Leop. Carol.Nat.Cur., XXIV, 1, (1872)

-

Untersuchungen über Bakterien

Beiträge zur Biologie der Pflanzen I, Heft 2, 127-224, Heft 3, 141-224. Breslau (1875)

EHRENBERG, C.G.

Beiträge zur Kenntnis der Organisation der Infusorien und ihrer geographischen Verbreitung.

Abhandl.königl.akad.Wiss. Berlin, (1830)

EHRENBERG, C.G. — Die Infusionsthierchen als vollkommene Organismen. Leipzig, (1838)

ELLIS, D. — Untersuchungen über Sarcina, Streptococcus und Spirillum. Zbl.Bakt.I.Abt.Ref. 33, 1-17, 87-96, 161-166, (1903)

ESMARCH, E. — Über die Reinkultur eines Spirillum. Zbl.Bakt.II.Abt. 1, 225-230 (1887)

FELIX, A. et GARDENER, A.D. — Le diagnostic sérologique de la fiévrie typhoide. Rapport et recommandations. Bull.trimestr.Organ.Hyg.(Soc. Nat.), b, 235-248 (1937)

FISCHER, A. — Untersuchungen über Bakterien. Pringsheim's Jahrbücher für wissenschaftliche Botanik XXVII, 1, (1895)

FÜHRMANN, F. — Die Geißeln von Spirillum volutans. Zbl.Bakt.II.Abt. 25, 125-161, (1910)

GAISSMAIER, U. — Untersuchung zur systematischen Stellung von zwei unter der Bezeichnung "Spirillum" geführten Stämmen. Med.Inaug.Diss.Tübingen (1963)

GIESBERGER, G. — Beiträge zur Kenntnis der Gattung Spirillum EHRENBERG. (Mit besonderer Berücksichtigung der Atmungsprozesse bei den Vertretern dieser Gattung). Med.Inaug.Diss.Delft (1936)

GIOVANARDI, A. Untersuchungen über ein besonderes, bei einigen mit Vi-Antigen versehenen B-typhi-Stämme beobachtetes Dissoziationsphänomen.
Zbl.Bakt.I.Abt.Ref. 141, 341-356 (1939)

HIRSCH, W. The agglutinability by Trypaflavine of B. typhosus and its relation of the Vi-Antigen.
J.Path.Bact. 44, 349-374, (1937)

HOUWINK, A.L. A macromollecular monolayer in the cell wall of Spirillum Spec.
Biochim.biophys.Acta (Amst.) 10, 160-170 (1953)

HUEPPE, F. Die Formen der Bakterien und ihre Beziehungen zu den Gattungen und Arten.
Wiesbaden (1886)

ITERSON, W. van Some remarks on the present state of our knowledge of bacterial flagellation.
Int.Congr.Microbiol. 6.th Congr.,Rome, 18-24 (1953)

KAUFFMANN, F. Über einen neuen Salmonella Typus (Salmonella bredeney) sowie die Bewertung der Antigentabelle.
Z.Hyg.Infekt.-Kr. 119, 356-372 (1937)

Die Bakteriologie der Salmonellen-Species, I.Auflage.
Kopenhagen, Munksgaard, (1961)

KEOGH, E.V., NORTH, E.A. and WARBURTON, M.F.
Haemagglutinins of the haemophilus group.
Nature London 160, 63-75 (1947)

KIENINGER, G.
Untersuchungen zur Methodik der indirekten Hämagglutination.
Med.Inaug.Diss.Tübingen, (1964)

KOLENBRANDER, P.E.
Isolation and chemical structure of the peptidoglycan of Spirillum serpens cell wall's.
J.Bact. 95, 201-210 (1968)

KUTSCHER, K.H. (a)
Die Vibrionen- und Spirillenflora der Düngerjauche.
Z.Hyg.Infekt.-Kr. 20, 46-59 (1895)

- (b)
Spirillum Undula minus und Spirillum Undula majus.
Zbl.Bakt.II.Abt. 18, 614-616 (1895)

LEEUWENHOEK, A. van
Aus dem 18. Brief an die Royal Socoety vom 9.X.1676, veröffentlicht in: Philosophical Transactions of the Royal Society of London.
14 (1683)

LEIFSON, E.
Staining Shape and Arrangement of Bacterial Flagella.
J.Bact. 62, 377-389 (1951)

LEWIS, I.M.
The genus Spirillum EHRENBERG with special reference to cell inclusions and the chromidial theory.
J.Bact. 40, 271-283 (1940)

MARTINEZ, J.F. — On the nature of the granules of the Genus Spirillum. Arch.Microbiol. 44, 334-341, (1963)

LEYER, A. — Die Zelle der Bakterien. Jena (1912)

MIGULA, W. — System der Bakterien. Band II, Jena, (1900)

MÜLLER, O.F. — Animalicula infusoria, fluviatilia et terrestrina, Hauniae, 43-77, (1786)

PIJPER, A. — The Flagella of Spirillum volutans. J.Bact. 57, 111-118, (1949)

PIJPER, A., CROCKER, C.G., VAN DER WALT, J.P., and SAVAGE, N. — Specific Agglutination of Spirillum serpens. J.Bact. 65, 636-641 (1952)

- — Flagellum and Motility of Spirillum serpens. J.Bact. 65, 628-635 (1953)

RITTENBERG, B.T., and RITTENBERG, S.C. — The growth of Spirillum volutans EHRENBERG in mixed and pure cultures. Arch.Microbiol. 42, 138-153 (1962)

REICHENBACH, H. — Über Verzweigungen bei Spirillen. Zbl.Bakt.II.Abt. 29, 553-557 (1901)

REICHERT, K. Über die Sichtbarmachung der Geißeln und die Geißelbewegung der Bakterien.
Zbl.Bakt.I.Abt.Ref. 51, 14-94, (1909)

SCHRÖDER, M. Die Assimilation des Luftstickstoffs durch einige Bakterien.
Zbl.Bakt.II.Abt. 85, 177-212, (1932)

SERTIC, V. et BOULGAKOV, N.A. L'agglutination par la trypaflavine des Salmonella de structure antigenique flagellaire non specifique.
C.R.Soc.Biol.(Paris) 123, 951-964 (1936)

SOROKIN, N. Über Spirillum endoparagogicum.
Zbl.Bakt.II.Abt. 7, 123-124, (1890)

SWELLENGREBEL, N.H. Neuere Untersuchungen über die vergleichende Cytologie der Spirillen und Spirochäten.
Zbl.Bakt.I.Abt.Ref. 49, 529-550 (1909)

VAHLE, C. Vergleichende Untersuchungen über die Myxobakteriazeen und Bakteriazeen, sowie die Rhodobakteriazeen und Spirillazeen.
Zbl.Bakt.II.Abt. 25, 178-260 (1910)

WAGNER, M. Studien mit fluoreszierenden Antikörpern an wachsenden Bakterien. II. Die Neubildung der Zellwand bei Spirillum serpens.
Zbl.Bakt.I.Abt.Ref. 203, 378-385 (1967)

WILLIAMS, M.A. (a) Some problems in the identification and classification of species of Spirillum. I 'Earlier taxonomy of the Genus Spirillum.
Int.Bull.bact.Nomencl. 9, 35-62 (1959)
II 'Later taxonomy of the Genus Spirillum.
Int.Bull.bact.Nomencl. 9, 137-157 (1959)

- (b) Chromatin patterns in Spirillum anulus.
J.Gen.Microbiol. (London) 21, 109-123 (1959)

- (c) Cell elongation and division in Spirillum anulus.
J.Bact. 78, 374-377 (1959)

- Flagellation in six species of Spirillum - a correction.
Int.Bull.bact.Nomencl. 10, 193-198 (1960)

WILLIAMS, M.A. and CHAPMAN, G.B. Electron microscopy of the flagellation in Species of Spirillum.
J.Bact. 81, 195-203 (1961)

WILLIAMS, M.A. and RITTENBERG, S.C. A taxonomic study of the genus Spirillum EHRENBERG.
Int.Bull.bact.Nomencl. 7, 49-112, (1957)

ZETTNOW, E. Über den Bau der großen Spirillen.
Z.Hyg.Infekt.-Kr. 24, 72-92 (1897)

Herrn Professor Dr. med. R.-E. Bader danke ich
für die Überlassung des Themas sowie für die
stets freundliche Unterstützung bei der Arbeit.

L e b e n s l a u f

Am 12. Juni 1937 wurde ich, Wolf Dietrich Mayer, als 2. Kind des Rektors Otto Mayer und seiner Ehefrau Marianne, geb. Lutz, in Weinsberg, Kreis Heilbronn, geboren.

Ich besuchte die Grundschulen in Weinsberg und Lorch, anschließend das Parler-Gymnasium in Schwäbisch Gmünd. Am Aufbaugymnasium in Michelbach/Bilz, Kreis Schwäbisch Hall, legte ich 1959 die Reifeprüfung ab.

Im Wintersemester 1959/60 begann ich an der Universität Tübingen mit dem Studium der Medizin, bestand im Sommer 1960 das Vorphysikum und im Frühjahr 1963 das Physikum. Im ersten klinischen Semester studierte ich in Kiel. Im Wintersemester 1963/64 kehrte ich nach Tübingen zurück und beendete hier im Oktober 1966 mein Studium mit dem medizinischen Staatsexamen.

Zur Zeit arbeite ich am Kreiskrankenhaus Aalen als Assistenzarzt auf der Inneren Abteilung.